



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105272915 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201410334134. 7

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 07. 14

(71) 申请人 上海医药工业研究院

地址 200040 上海市静安区北京西路 1320  
号

申请人 中国医药工业研究总院

(72) 发明人 华茉莉 许玉 黄磊 徐云辉  
袁帅

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283  
代理人 薛琦

(51) Int. Cl.

C07D 221/22(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

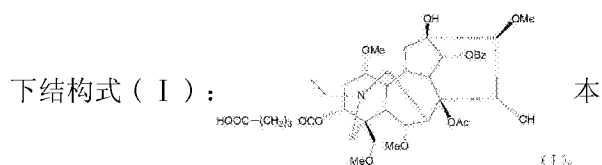
权利要求书1页 说明书10页 附图8页

(54) 发明名称

半抗原化合物及其多抗、试剂盒与应用

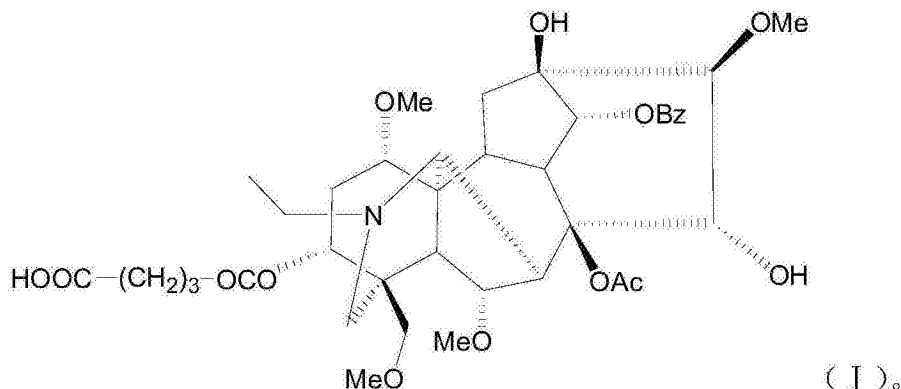
(57) 摘要

本发明涉及生物工程技术领域,特别是涉及一种半抗原化合物 3- 戊二酰基乌头碱,它具有如

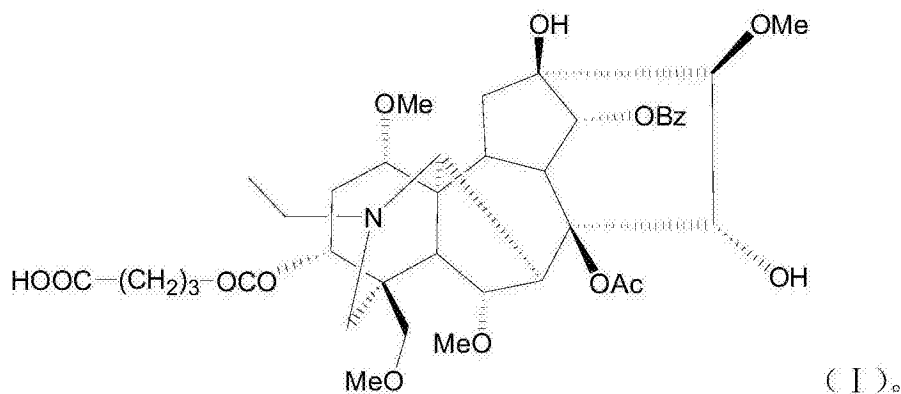


发明还公开了由上述半抗原化合物与牛血清白蛋白的偶联物免疫新西兰兔获得的多克隆抗体及其试剂盒。本发明的多克隆抗体及其试剂盒可用于检测双酯型乌头碱。

1. 一种半抗原化合物 3-戊二酰基乌头碱,其特征在于,它具有如下结构式 ( I ):



2. 一种双酯型乌头碱的多克隆抗体,由半抗原与牛血清白蛋白的偶联物免疫新西兰兔后获得,其特征在于,所述半抗原为具有如下结构式 ( I ) 的 3-戊二酰基乌头碱:



3. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体,其特征在于,所述 3-戊二酰基乌头碱可经由以下方法制得:

(1) 称取乌头碱 50mg、戊二酸酐 8.8mg 以及吡啶 2mL 反应 20h,用 3ml 冰水终止反应后,用 3 倍量的乙酸乙酯萃取 3 次,减压蒸干反应物;

(2) 用 Sephadex LH-20 柱层析纯化步骤 (1) 所得的反应物,以甲醇 / 二氯甲烷为洗脱液进行洗脱,收集流出液,减压蒸干即得。

4. 如权利要求 2 所述的多克隆抗体在检测双酯型乌头碱中的应用。

5. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含如权利要求 2 所述的双酯型乌头碱的多克隆抗体。

## 半抗原化合物及其多抗、试剂盒与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,特别是涉及一种半抗原化合物及其多克隆抗体、试剂盒与应用。

### 背景技术

[0002] 乌头碱类化合物为二萜型生物碱,依据其结构母核上取代基的不同划分为三类:①双酯型,包括次乌头碱、乌头碱、新乌头碱等,有一定的抗炎镇痛作用,但也是中药材附子毒性的主要源头,其致毒剂量极小,如 1-2mg 乌头碱即可致人死亡。②单酯型,包括苯甲酰乌头碱,苯甲酰中乌头碱,苯甲酰次乌头碱等,毒性相对较小,有镇痛,抗心律不齐及抗癫痫作用。③无酯型,包括乌头原碱、新乌头原碱等,可抗心律失常,且毒性更低。由此可见,不同的乌头碱类生物碱具有较为相近的生物学活性,但其毒性存在明显差异且与结构密切相关。

[0003] 一方面,乌头碱类生物碱的药效剂量较低,且安全剂量范围相对较窄,临床个体差异对用药的有效与安全影响明显;另一方面,附子的炮制减毒,实际是以水溶去除大部分生物碱和以水解将双酯型生物碱转化为单酯型生物碱的过程,药材来源的差异与炮制过程的控制直接关系到附子的质量评价。因此,对毒性双酯型乌头碱的检测与监控显得极为必要和关键。

[0004] 目前,对附子中乌头碱类生物碱的检测,较为通用的方法是 HPLC 法及 LC-MS 法。2010 年版中国药典采用 HPLC 法,分析其中双酯型的新乌头碱、次乌头碱、乌头碱的含量并规定三者的合计含量 $\leq 0.02\%$ 。然而,乌头碱类生物碱的极性小,检测用色谱条件控制较复杂,且分析时间超长(65min),极其不便;与此同时,由于检测的药效成分和毒性成份含量均较低,合计含量也仅为万分之二,分析时样品处理、条件控制或人员操作稍有差异或波动,即可带来测定结果的明显偏差。国家法部司法鉴定科学技术研究所则建立以 LC-MS 法检测生物检材中乌头碱、新乌头碱和次乌头碱的含量方法和标准,然而,定量 LC-MS 法对检测设备要求高投入大,难以普遍推广应用,而且对检测样品的预处理也极为繁琐。因此,对附子中活性及毒性乌头碱类生物碱的有效监控需要研究开发更简便、更灵敏、更可靠的检测方法。

[0005] 免疫分析法是基于抗体与抗原或半抗原之间的高度特异性及敏感性而建立起来的一种生物分析法,相比传统色谱方法,它对于微量痕量成分的准确快速检测具有无法比拟的技术优势:样品的预处理简单、准确度极高、灵敏度高,检测限度可达 ng 甚至 pg 级,检测时间仅需 3-5min,适合样品的现场即时监控以及大批量样品的快速分析。

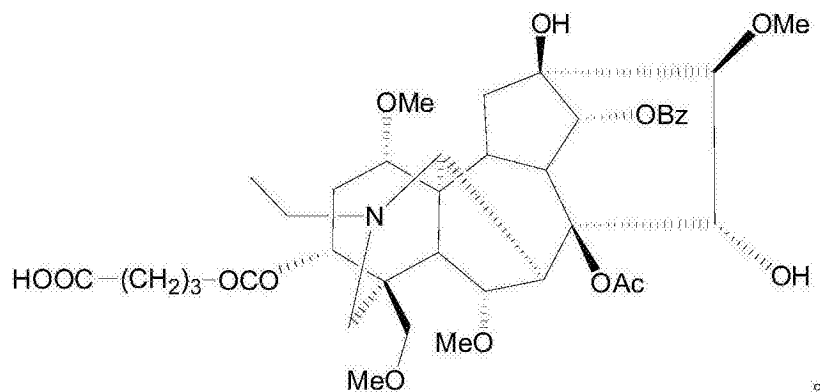
[0006] 利用抗体开展对微量痕量中药成分的定性定量分析、中药成分的体内药代动力学研究已逐步得到应用,具体方法有亲和色谱法、免疫色谱法、免疫印迹法等。虽然抗体-免疫分析方法的研发,先期投入较大技术要求较高,但一旦研发成功,可形成特征性抗体的工程菌株,为专有技术,不仅寻求专利保护,而且还可以由此开发出如酶联免疫检测试剂盒等市场应用型的产品,因而具有良好的应用前景和市场开发价值。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的旨在提供一种能够特异性识别双酯型乌头碱的多克隆抗体及其试剂盒与应用。

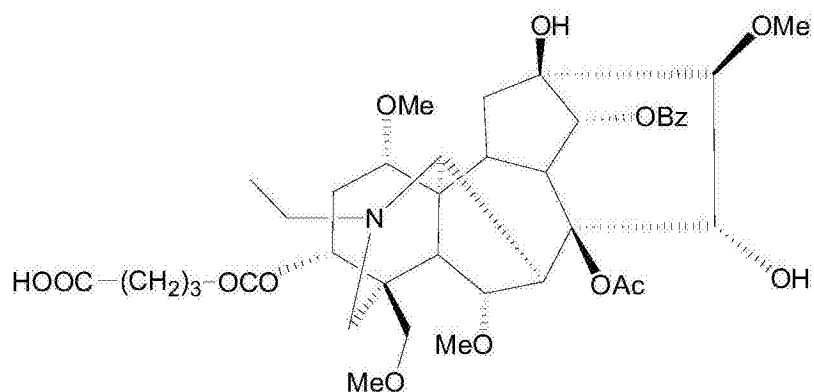
[0008] 具体地说,本发明的第一方面是提供了一种半抗原化合物 3-戊二酰基乌头碱,其特征在于,它具有如下结构式(I):

[0009]



[0010] 本发明的第二方面是提供了一种双酯型乌头碱的多克隆抗体,可由半抗原与牛血清白蛋白的偶联物免疫新西兰兔获得,所述半抗原为具有如下结构式(I)的 3-戊二酰基乌头碱:

[0011]



式(I)。

[0012] 在一优选例中,所述 3-戊二酰基乌头碱可经由以下方法制得:

[0013] (1) 称取乌头碱 50mg、戊二酸酐 8.8mg 以及吡啶 2mL 反应 20h,用 3mL 冰水终止反应后,用 3 倍量的乙酸乙酯萃取 3 次,减压蒸干反应物;

[0014] (2) 用 Sephadex LH-20 柱层析纯化步骤(1)所得的反应物,以甲醇/二氯甲烷为洗脱液进行洗脱,收集流出液,减压蒸干即得。

[0015] 本发明的第三方面是提供了上述多克隆抗体在检测双酯型乌头碱中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含上述双酯型乌头碱的多克隆抗体。

[0017] 本发明的双酯型乌头碱多克隆抗体,具有如下优点:

[0018] 1. 本发明的双酯型乌头碱多抗可以稀释 80000 倍使用,从而降低了成本;

[0019] 2. 本发明的双酯型乌头碱多抗的检测限为 250pg,灵敏度较高;

[0020] 3. 本发明的双酯型乌头碱多抗特异性强,与单酯型乌头碱的交叉反应均小于8%,而与去甲乌药碱无交叉反应。

[0021] 本发明各个方面的细节将在随后的章节中得以详尽描述。通过下文以及权利要求的描述,本发明的特点、目的和优势将更为明显。

#### 附图说明

[0022] 图1为半抗原(AC-GS)的ESI-MS图谱。

[0023] 图2为半抗原(AC-GS)的<sup>1</sup>H-NMR图谱。

[0024] 图3为半抗原(AC-GS)的HMBC二维谱。

[0025] 图4为半抗原(AC-GS)的HSQC二维谱。

[0026] 图5为半抗原(AC-GS)的<sup>13</sup>C-NMR图谱。

[0027] 图6牛血清白蛋白的MALDI-TOFMS图谱(分子量66431.1Da)。

[0028] 图7乌头碱免疫抗原的MALDI-TOFMS图谱(分子量79724.3Da)。

[0029] 图8双酯型乌头碱检测试剂盒的标准曲线。

#### 具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件(其中,乌头碱对照品购自成都曼斯特生物公司;N,N'-二环乙基碳化亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂、TMB、牛血清白蛋白(BSA)以及卵清白蛋白OVA等均购自美国Sigma公司;其他化学试剂均符合分析标准;新西兰大白兔2只,雄性,每只体重2.5kg)。除非另外说明,否则所有的百分数、比率、比例、或份数按重量计。

[0031] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0032] 本发明提到的上述特征,或实施例提到的特征可以任意组合。本专利说明书所揭示的所有特征可与任何组合物形式并用,说明书中所揭示的各个特征,可以任何可提供相同、均等或相似目的的替代性特征取代。因此除有特别说明,所揭示的特征仅为均等或相似特征的一般性例子。

[0033] 实施例1 半抗原—3-戊二酰基乌头碱(AC-GS)的制备及鉴定

[0034] 1. 称取乌头碱50mg、戊二酸酐8.8mg、吡啶2mL反应20h,用3mL冰水终止反应后,用3倍量的乙酸乙酯萃取3次,减压蒸干。

[0035] 2. 反应物用Sephadex LH-20柱层析纯化,以甲醇/二氯甲烷为洗脱液,收集流出液,减压蒸干得纯品。

[0036] 3. 经过ESI-MS、<sup>13</sup>C-NMR、<sup>1</sup>H-NMR、HMBC、HSQC二维谱鉴定式I化合物化学结构。ESI-MS测定仪器:MSD-Trap-XCT,Q-ToF micro(ESI-MS)型质谱仪(Agilent公司),<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR及HMBC、HSQC测定均采用AVANCE IIII-400核磁共振仪(Bruker公司)

[0037] 3.1. 从ESI-MS看出,式I化合物分子离子峰m/z信号为760.4[M]<sup>+</sup>,说明反应产

物相对分子质量为 759,与乌头碱相对分子质量相比增加 114,这与乌头碱与一分子戊二酸酐单酯化后的产物增加的相对分子质量正好一致,说明戊二酸酐已经与乌头碱产生了酯化反应(图 1)。

[0038] 3. 2.  $^1\text{H}$ -NMR 谱(图 2)中出现  $\delta_{\text{H}} = 4.98$  的 H,且 HMBC 谱(图 3)中  $\delta_{\text{H}} 4.94$  的 H 与  $\text{C}=\text{O}$  上的 C 有相关性即是发生反应的 C 上的 H,HSQC 二维谱(图 4)中  $\delta_{\text{H}} = 4.98$  对应的  $\delta_{\text{C}} = 71.84$ ,且  $\delta_{\text{H}} = 4.94$  的 H 与  $\text{C}_4$  和  $\text{C}_{19}$  相关,推断戊二酸连接在  $\text{C}_3$  位置上,即式 I 结构为 3-戊二酰基乌头碱。

[0039]  $^1\text{H}$ -NMR 谱(图 2)和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱(图 5)的具体解析结果如表 1 和表 2 所示:

[0040] 表 1  $^1\text{H}$ -NMR 谱的解析结果

[0041]

序号	文献 $\delta_{\text{C}}$ 400Hz	本实验 $\delta_{\text{H}}$ 400MHz
1	3.15	3.186 (1H,m)
2	2.42 1.95	2.423 (1H,m), 1.958 (1H,m)

[0042]

3	3.76dd	4.945 (1H,dd,J=12,5.6Hz)
4	-	-
5	2.14	2.306 (1H,d,J=6.8Hz)
6	4.05	4.081 (1H,d,J=6Hz)
7	2.84	2.854 (1H,s)
8	-	-
9	2.91	2.907 (1H,d,J=8.8Hz)
10	2.15	2.112 (1H,m)
11	-	-
12	2.7	2.125(1H,m), 2.854(1H,m)
13	-	-
14	4.88	4.867 (1H,d,J=4.8Hz)
15	4.48dd	4.445 (1H,dd,J=5.2,13.2Hz)
16	3.36	3.305 (1H,d,J=4.8Hz)
17	3.12	3.206 (1H,s)
18	3.51/2.62	2.973 (1H,d,J=8.8Hz) , 3.779 (1H,d,J=8.8Hz)
19	2.42/2.35	2.414 (1H,d,J=7.2Hz) 2.907 (1H,d,J=8.8Hz)
N-CH2		2.541 (1H,d,J=4Hz) , 2.823 (1H,d,J=4Hz)
N-CH2-CH3	1.14	1.133 (3H,t,J=6.8)
1-O-CH3	3.28	3.250 (3H,s)
6-O-CH3	3.30	3.192 (3H,s)
16-O-CH3	3.76	3.727 (3H,s)
18-O-CH3	3.17	3.737 (3H,s)
Ph-2,6	8.03	8.04 (2H,d,J=7.2Hz)
Ph-3,5	7.46	7.439 (2H,t,J=7.2Hz)
Ph-4	7.58	/
CH3-CO	1.40	1.390 (3H,t)
-C0CH2CH2CH2CO0H	/	1.958 (1H,d,J=7.2Hz) 2.414 (1H,d,J=7.2Hz)

[0043] 表 2  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱解析结果

[0044]

序号	文献 $\delta$	本实验 $\delta$
	150	400MHz
1	82.38	81.86
2	33.66	33.76
3	71.51	71.84
4	43.15	42.63
5	46.87	45.95
6	83.40	83.6
7	44.74	44.70
8	92.07	91.9
9	44.23	45.54
10	40.91	40.74
11	50.01	49.92
12	35.85	36.43
13	74.05	74.36
14	78.85	79
15	78.93	79
16	90.00	90.4
17	60.98	61
18	76.79	72.14
19	47.01	47.75
N-CH <sub>2</sub>	48.91	49.41
N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	13.32	13.27
1-O-CH <sub>3</sub>	55.90	56.46
6-O-CH <sub>3</sub>	57.98	58.5
16-O-CH <sub>3</sub>	61.12	61.2
18-O-CH <sub>3</sub>	59.11	58.99
14-O-CO-	166.07	166.3
Ph-1	129.81	130
Ph-2,6	129.61	129.9
Ph-3,5	128.64	128.9

[0045]



Ph-4	133.26	133.5
CH <sub>3</sub> -CO	172.40	172.2
CH <sub>3</sub> -CO	21.43	21.54
-C <sub>0</sub> C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> CO <sub>0</sub> H		174.3
-CO <sub>0</sub> H		177.39
-C <sub>0</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>0</sub> H		33.29
-C <sub>0</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>0</sub> H		33.78
-C <sub>0</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>0</sub> H		20.37

[0046] 实施例 2 免疫抗原 (AC-GS-BSA) 和包被抗原 (AC-GS-OVA) 的制备

[0047] 1. 准确称取 3- 戊二酰基乌头碱 10mg、N- 羟基琥珀酰亚胺 1.5mg、N, N' - 二环乙基碳化亚胺 30mg 添加至 1mL DMF 中, 置磁力搅拌器上避光室温搅拌 4h。将 20mg BSA 溶于 2mL 0.01mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH7.4) 中, 然后在搅拌下逐滴加入到上述反应液中, 于 4℃ 搅拌反应过夜。

[0048] 2. 反应完毕后将反应物用双蒸水透析 72h, 冷冻干燥得白色粉末, -20℃ 保存。

[0049] 3. 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOFMS) 鉴定免疫原偶联物 (AC-GS-BSA) 的偶联情况:

[0050] MALDI-TOFMS 可以直接显示免疫操作的半抗原数 (Hapten Number), 方法简洁快速。

[0051] 图 6 为 BSA 的 MALDI-TOFMS 图谱, 由该图可知 BSA 的分子量为 66431.1Da。

[0052] 图 7 为 AC-BSA 复合物的 MALDI-TOFMS 图谱, AC-BSA 的主峰出现于 m/z80348.5Da 附近。

[0053] 已知乌头碱的分子量是 759.4, 可计算得到 AC-BSA 的偶联率为 18。

[0054] 计算公式 = (AC-BSA-BSA)/AC = (79724.3/80348.5-66431.1)/759.4。

[0055] 4. 用相同方法制备包被抗原即 3- 戊二酰基乌头碱与鸡血清白蛋白的偶联物 (AC-GS-OVA)。

[0056] 实施例 3 用免疫抗原免疫新西兰兔获得双酯型乌头碱多抗

[0057] 一、免疫抗原的配置: AC-GS-BSA 溶液加入弗氏完全佐剂形成白色油包水型的乳浊液。加强免疫时, 将相同浓度的 AC-GS-BSA 加入等体积的弗氏不完全佐剂。

[0058] 二、免疫动物: 兔子在免疫前单笼饲养 7-10 天, 观察健康状况后进行免疫。在免疫前耳缘静脉取血 1.5-2mL 作为阴性血清。首次免疫时, 每只兔子于脊柱两侧分 6 点皮下注射, 每隔 14 天进行 1 次加强免疫。末次免疫后第 7 天, 兔颈动脉取血, 分离多克隆抗体血清。

[0059] 三、免疫监控: 以免疫前兔血清为阴性对照, 每次加强免疫后 7d 从兔耳缘静脉取血 1mL, 按血清效价测定方法进行效价测定。

[0060] 采用间接 ELISA 方法测定:

[0061] (1) 将浓度为 25 μg/ml 的包被抗原 (AC-GS-OVA, 按实施例 2 的方法制备) 包被酶标板, 4℃ 过夜;

[0062] (2) 采用洗液洗板后用封闭液进行封闭, 150  $\mu$  L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

[0063] (3) 洗液洗板后, 每孔加入 100  $\mu$  L 从 1:1000 开始倍比稀释的抗体血清, 另用空白血清作阴性对照, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

[0064] (4) 洗液洗板, 每孔加入稀释 10000 的 HRP 标记山羊抗鼠酶标二抗 100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;

[0065] (5) 洗液洗板, 每孔加入显色液 100  $\mu$  L, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 20min 后每孔加入 50  $\mu$  L 终止液后在酶标仪上测定各孔 OD<sub>450nm</sub> 值。阴性对照 OD<sub>450</sub> 值为 N, 阳性对照 OD<sub>450</sub> 值为 P。若  $P/N \geq 2.1$  且  $P-N > 0.2$  即为阳性, 若  $1.5 < P/N < 2.1$  为可疑,  $P/N \leq 1.5$  为阴性。

[0066] 四、血清处理方法: 免疫结束后兔颈动脉取血, 室温静置 1h, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 待其凝固, 略有上清析出时, 3000rpm 离心 10min, 取出上层抗血清。与等量甘油混合后 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

[0067] 实施例 4 双酯型乌头碱多抗的纯化

[0068] 1. 用 50% 饱和硫酸铵沉淀:

[0069] (1) 逐滴加入饱和硫酸铵 5ml, 前期要等出现的沉淀溶解后再继续, 直至不再溶解, 继续加完至 50%, 放入冰箱, 4 $^{\circ}$ C 下静置 2h;

[0070] (2) 将所得血清沉淀物转入离心管中, 4 $^{\circ}$ C 下 10000r/min 离心 30min, 将上清液弃去, 取沉淀物溶于 2ml PBS。

[0071] 2. 用 33% 饱和硫酸铵沉淀:

[0072] 取上述含沉淀的 PBS 溶液, 逐滴加入 1.2ml 的饱和硫酸铵至 33%, 4 $^{\circ}$ C 静置 2h, 同样条件下离心, 取沉淀物, 用 1ml PBS 溶解沉淀。

[0073] 实施例 5 双酯型乌头碱多抗的特性鉴定

[0074] 一. 双酯型乌头碱多抗的鉴定

[0075] (1) 蛋白含量测定: 取 25 $\mu$ l 蛋白标品与样品加入到 96 孔板的各孔中; 每孔加入 200 $\mu$ l 的 BCA 工作液, 摇晃混匀 30s, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; 冷却至室温, 使用酶标仪在 562nm 检测吸光值; 以 BSA 浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。在标准曲线的线性范围内, 根据各蛋白试样的校正吸光值, 以及样品稀释度, 计算出样品的蛋白浓度为 23.12mg/ml。

[0076] (2) 双酯型乌头碱抗体的特异性鉴定: 系列稀释乌头碱, 中乌头碱, 次乌头碱, 苯甲酰乌头碱, 苯甲酰中乌头碱, 苯甲酰次乌头碱, 用间接竞争 ELISA 方法检测多抗与其的交叉反应: 取出 10  $\mu$ g/ml 的包被抗原包被好的酶标板, 洗液洗板后, 加入封闭剂 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时; 洗液洗板后, 每孔加入 50  $\mu$  L 的竞争药物和 50  $\mu$  L 稀释到最适浓度的抗体溶液进行竞争反应, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时; 洗液洗板后, 加入 HRP 标记羊抗鼠酶标二抗, 100  $\mu$  L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育; 洗液洗板后, 加底物显色, 100  $\mu$  L/孔, 37 $^{\circ}$ C 显色后直接加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50  $\mu$  l/孔; 用酶标仪测定终止反应后的酶标板在 450nm 处的吸光值。交叉反应计算公式如下:

[0077] 交叉反应 (%) =  $[IC_{50}(\text{半抗原})/IC_{50}(\text{竞争药物})] \times 100\%$

[0078] 结果表明 (表 3): 乌头碱 (AC) 与双酯型乌头碱类化合物中乌头碱 (MC)、次乌头碱 (HC) 的交叉反应为 59.71%、78.81%, 与单酯型乌头碱类化合物苯甲酰乌头碱 (BAC)、苯甲酰中乌头碱 (BMC)、苯甲酰次乌头碱 (BHC) 的交叉反应分别为 7.6%、1.85%、4.47%, 而与去甲乌药碱无交叉反应。

[0079] 表 3 与其他化合物的交叉反应表

[0080]

化合物	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	交叉反应 (%)
AC	2.20	100
MC	3.36	59.71
HC	2.72	78.81
BAC	69.02	7.6
BMC	211.21	1.85
BHC	309.07	4.47

[0081] 实施例 6 双酯型乌头碱酶联免疫检测试剂盒的制备及其应用

[0082] 一、酶联免疫试剂盒由下述物质组成：

[0083] (1) 预包被抗原的酶标板：用包被缓冲液将包被抗原稀释成 5 μg/ml，每孔加入 100 μl，4℃ 过夜，次日倾去包被液，用稀释好的洗液洗涤 3 次，拍干，然后在每孔中加入 150 μl 封闭液，37℃ 温育 2h，倾去孔内液体，干燥后用铝箔袋密封保存。

[0084] (2) 双酯型乌头碱对照标准品和阴性对照标准品。

[0085] (3) 双酯型乌头碱多抗

[0086] (4) 辣根过氧化物酶标记的兔二抗。

[0087] (5) 抗体稀释液：0.01M PBS, pH7.6。

[0088] (6) 10× 浓缩洗液：含有 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液，pH7.4。

[0089] (7) 显色液 A 液，显色液 B 液。使用前将 A 液与 B 液等体积混合。

[0090] (8) 终止液：2M 硫酸溶液。

[0091] 二、试剂盒的应用

[0092] (一) 检测方法

[0093] 1. 样品前处理

[0094] 取生附子粉末 2.0g，精密称定，置于塞锥形瓶中，加氨试液 3ml，精密加入异丙醇-乙酸乙酯 (1:1) 混合溶液 50ml，称定重量，超声处理 30 分钟，放冷，再称定重量，用异丙醇-乙酸乙酯 (1:1) 混合溶液补足减少的重量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 25ml，40℃ 下减压回收溶剂至干，残渣精密加入乙醇混合溶液 6ml 溶解，滤过即得。用乙醇稀释成 10-50 倍的溶液。将上述溶液用 PBS 稀释成含 10% 乙醇的待测样品溶液。

[0095] 2. 双酯型乌头碱标准溶液配制

[0096] 将乌头碱标准品用乙醇配制 500000-50ng/mL 的不同浓度溶液，将上述溶液用 PBS 稀释成含 10% 乙醇的标准溶液。

[0097] 3. 用试剂盒检测

[0098] (1) 检测步骤

[0099] 取出所需数量的微孔和所有试剂常温下放置 10min。先分别加 50 μL 各浓度的双酯型标准液以及待测样品加到微孔中，再加入 50 μL 的双酯型乌头碱多抗稀释液 (1:80000)，阳性对照孔为 50 μL 多抗稀释液加 50 μL 含 10% 乙醇的 PBS，空白孔为 50 μL PBS

加 50  $\mu$  L 含 10% 乙醇的 PBS, 37°C, 孵育 120min。倒去孔内液体, 加入 400  $\mu$  L 洗液到每个微孔内, 轻轻晃动数秒, 快速翻转将微孔内液体倒尽, 向一叠干净的吸水纸拍几下, 如此重复操作共洗板 3 次。加入 100  $\mu$  L 酶标二抗工作液, 37°C, 孵育 60min。倒去孔内液体并洗板 3 次。将显色 A 液和显色 B 液等量混合配成底物显色液。每个微孔加入 100  $\mu$  L 的底物显色液, 室温避光显色 15-20min。加入终止液 100  $\mu$  L, 用酶标仪于 450nm 下测定吸光度值。

[0100] (2) 试剂盒重复性和稳定性测试以及结果计算

[0101] 板内精密度测试: 取同一块酶标板上的 6 个微孔, 用待测样品进行测试, 实验重复 3 次。

[0102] 板间精密度测试: 取同一批次的 3 块酶标板, 用待测样品进行测试, 实验重复 3 次。

[0103] 变异系数的计算方法: 变异系数 (CV) = 测定结果的标准差与其平均值的百分比。

[0104] 结果计算: 以加入双酯型乌头碱标准品时的吸光值为 B, 不加标准品时的吸光值为 B<sub>0</sub>, B/B<sub>0</sub> 为纵坐标, lg(标准品, ng/mL) 为横坐标; 以  $\ln((B/B_0)/(1-B/B_0))$  为纵坐标, lg(标准品, ng/mL) 为横坐标, 如图 8 所示, 线性方程为  $Y = -1.6768x + 5.5858$ ,  $R^2 = 0.9982$ 。线性范围为 25ng/ml ~ 25  $\mu$  g/ml, 检测限为 250pg, 灵敏度较高, 计算出生附子药材中双酯型乌头碱含量为 1.303mg/g (表 4 和表 5)。

[0105] 表 4 板内重复性测试结果

[0106]

样品编号	孔 1	孔 2	孔 3	孔 4	孔 5	孔 6	均值	RSD (%)
含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	1.315	1.366	1.321	1.277	1.243	1.304	1.304	2.91

[0107] 表 5 板间重复性测试结果

[0108]

样品编号	板 1	板 2	板 3	均值	RSD (%)
含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	1.28	1.24	1.21	1.24	2.14

[0109] 本发明所涉及的多个方面已做如上阐述。然而, 应理解的是, 在不偏离本发明精神之前提下, 本领域专业人员可对其进行等同改变和修饰, 所述改变和修饰同样落入本申请所附权利要求的覆盖范围。

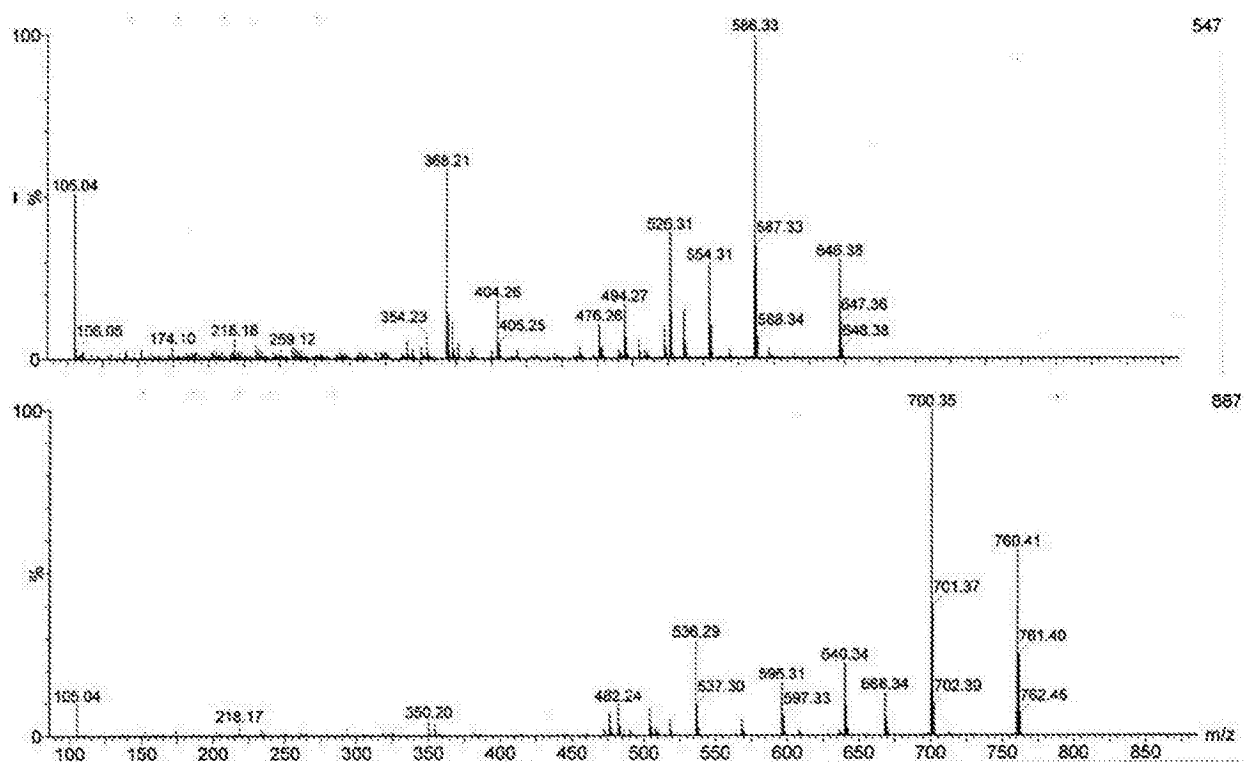


图 1

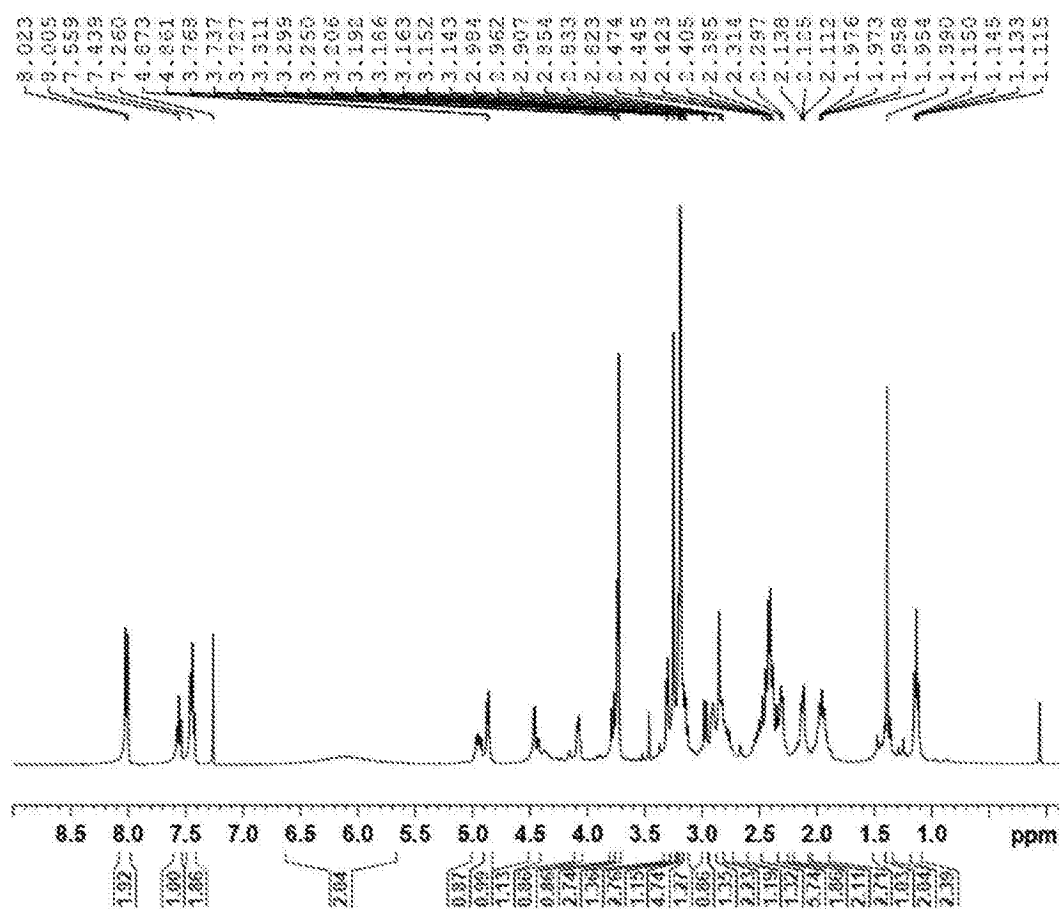


图 2

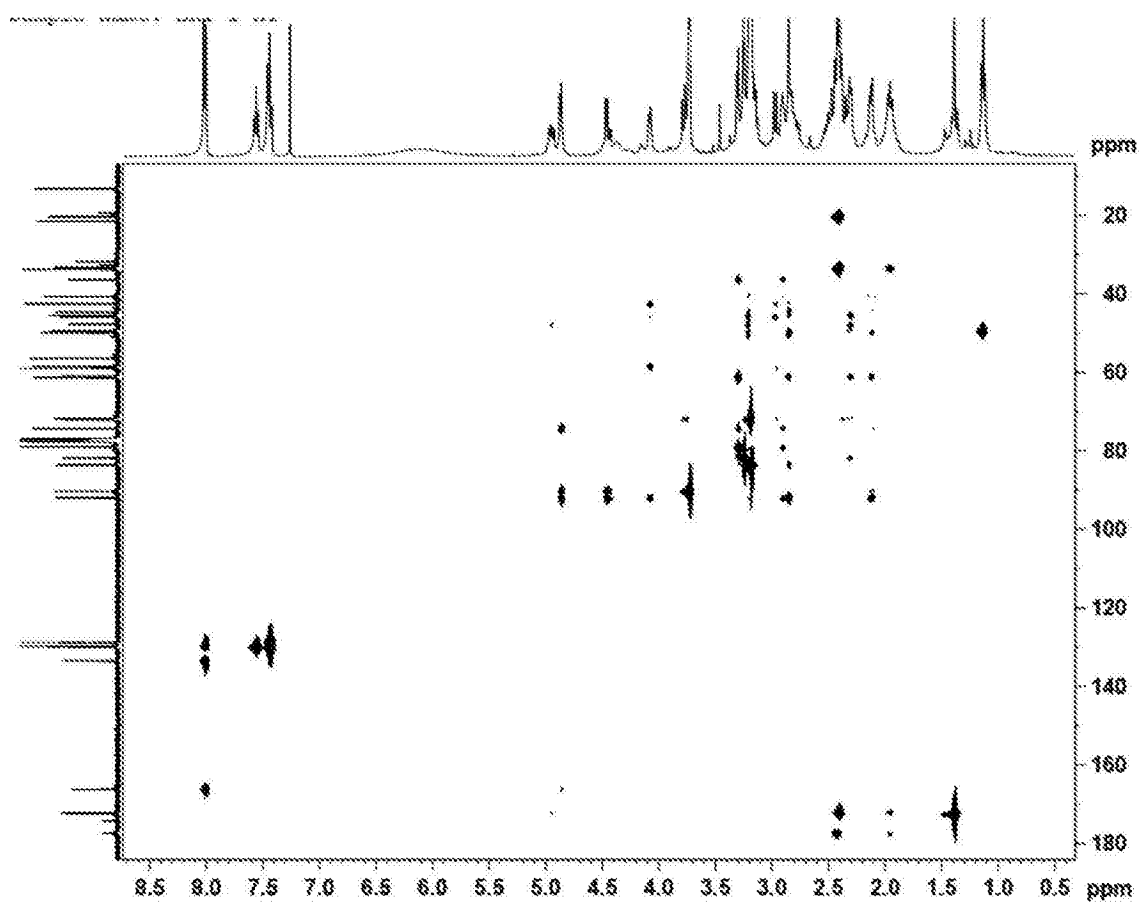


图 3

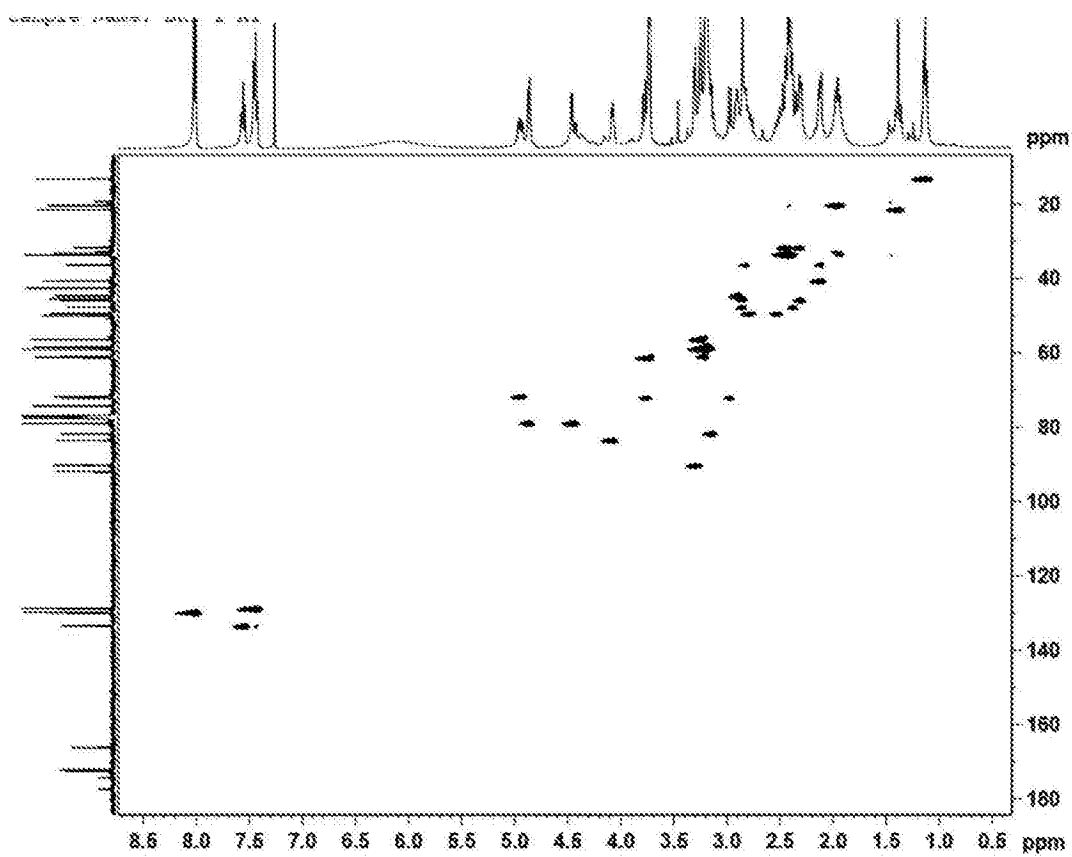


图 4



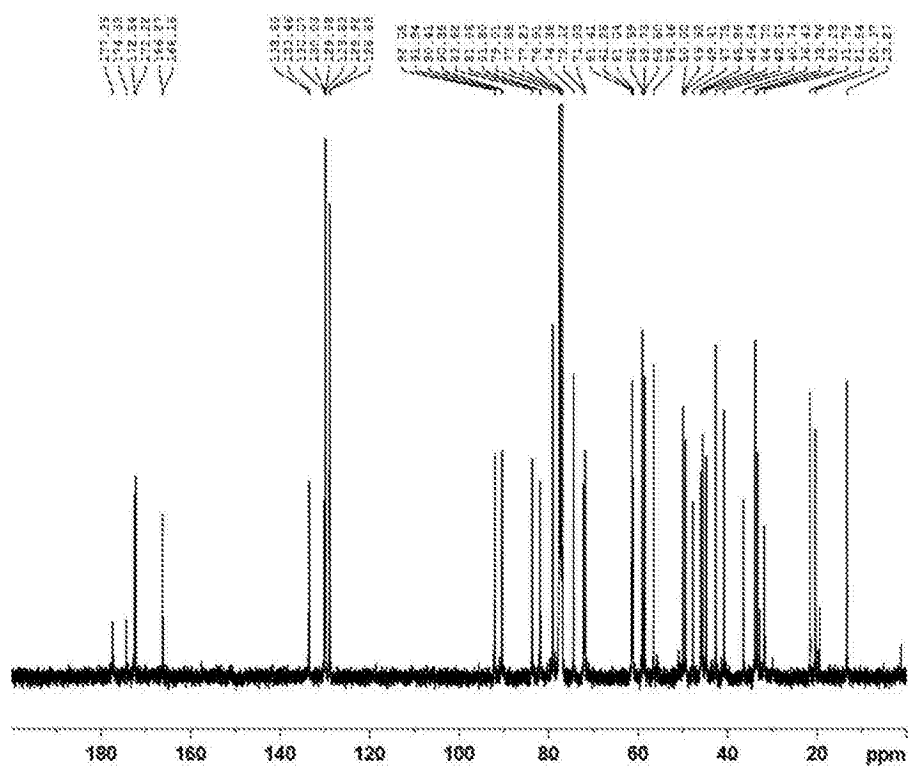


图 5

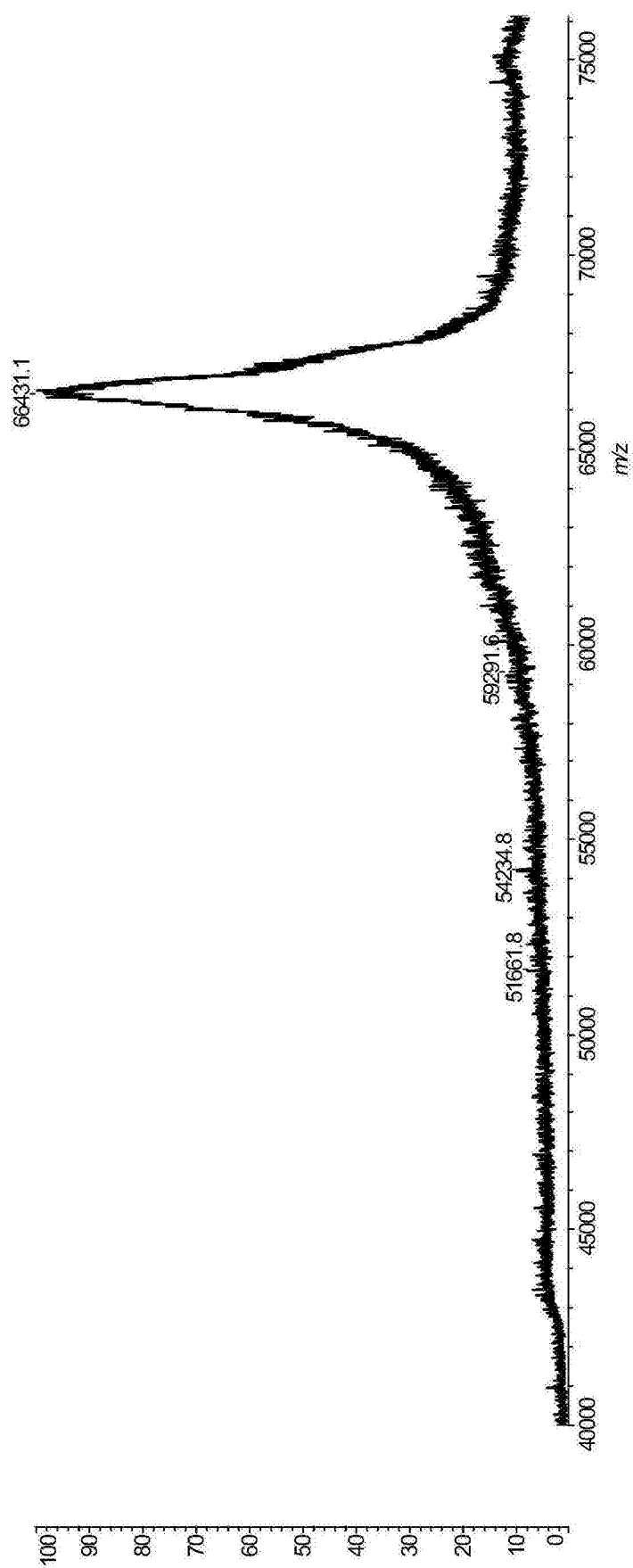


图 6

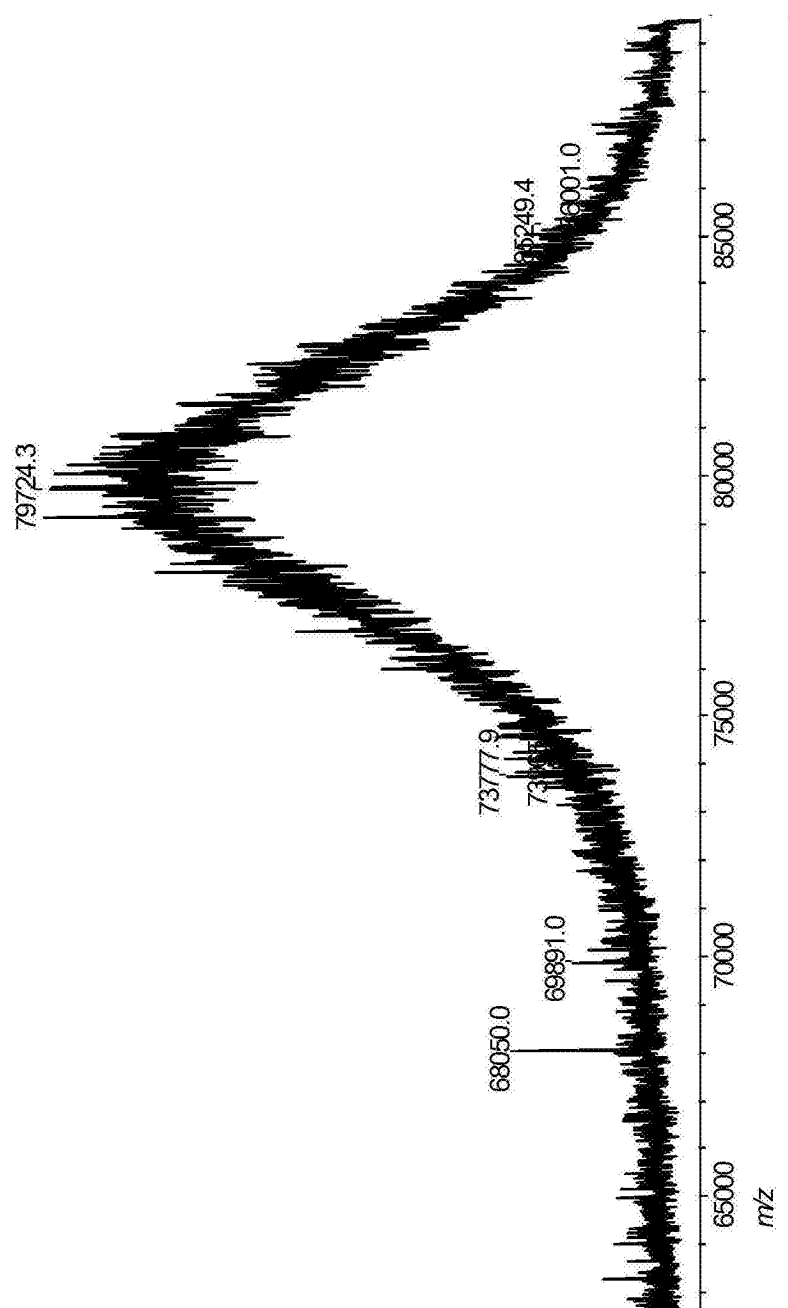


图 7

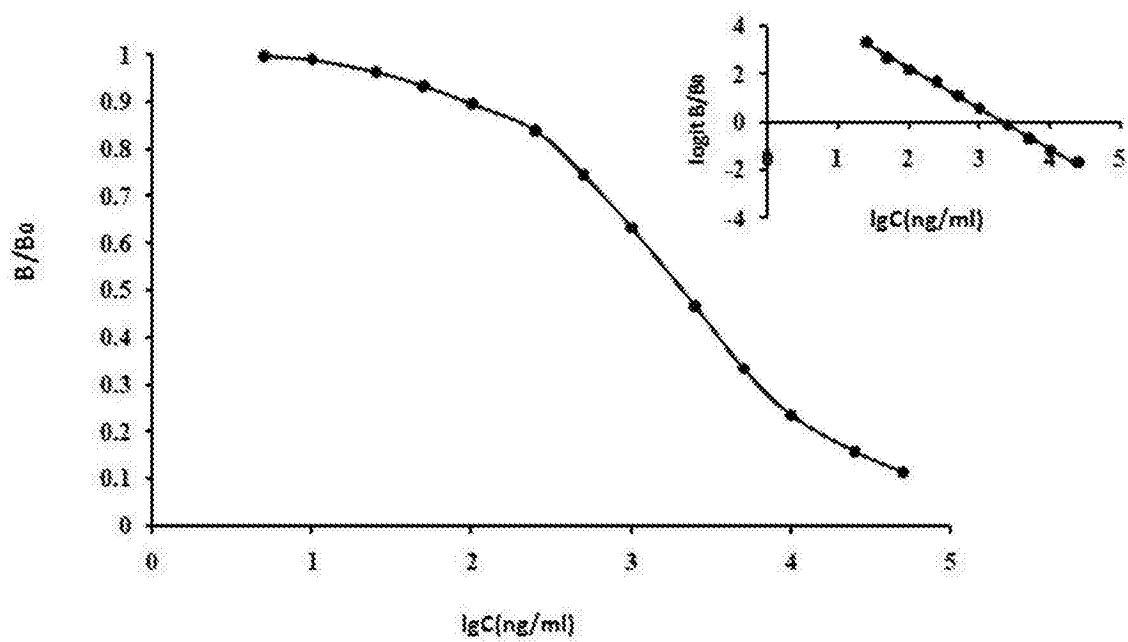


图 8

